

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K01962

研究課題名（和文）脊髄小脳失調症31型モデル個体に効果を示すRNAリピート結合分子の作用機序解明

研究課題名（英文）Elucidation of action mechanism of repeat RNA-binding small molecules that improve disease phenotype in spinocerebellar ataxia type 31

研究代表者

柴田 知範 (Shibata, Tomonori)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：80711960

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、脊髄小脳失調症31型モデル個体の症状を改善する低分子の作用機序を分子レベルで解明する事である。本研究では、新たに見出した脊髄小脳失調症31型の原因となるUGGAAリピートを標的とする低分子が、UGGAAリピートとRNA結合タンパク質の相互作用及びリピートRNAの凝集体形成を阻害することを明らかにするとともに個体レベルでリピートRNA毒性を軽減できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄小脳失調症31型(SCA31)は、TGGAAリピートが原因で発症する難治性疾患であり、TGGAAリピートから転写されるUGGAAリピートが関与するRNA介在性神経疾患である。現時点ではSCA31を完治する方法はなく、症状改善に資する治療法開発が待たれている。

本研究成果により、UGGAAリピート結合分子によるリピートRNAの機能制御及びSCA31モデルショウジョウバエにおける治療効果が実証され、これらの分子ツールを用いた発症機構の分子レベルでの解明や治療法開発の進展などが期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study is aimed to elucidate the action mechanism of small molecules that alleviate disease phenotype in spinocerebellar ataxia type 31 (SCA31) model. In this study, we found naphthyridine carbamate dimer (NCD) as small molecules targeting UGGAA repeat in SCA31. NCD inhibited the interaction of UGGAA repeats with RNA-binding proteins and the formation of nuclear RNA foci consisting of UGGAA repeat. We demonstrated that NCD alleviated UGGAA repeat-mediated RNA toxicity in SCA31 Drosophila model, suggesting that targeting UGGAA repeat by small molecules have a potential for treatment of SCA31.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：脊髄小脳変性症31型 UGGAAリピート RNA結合性低分子

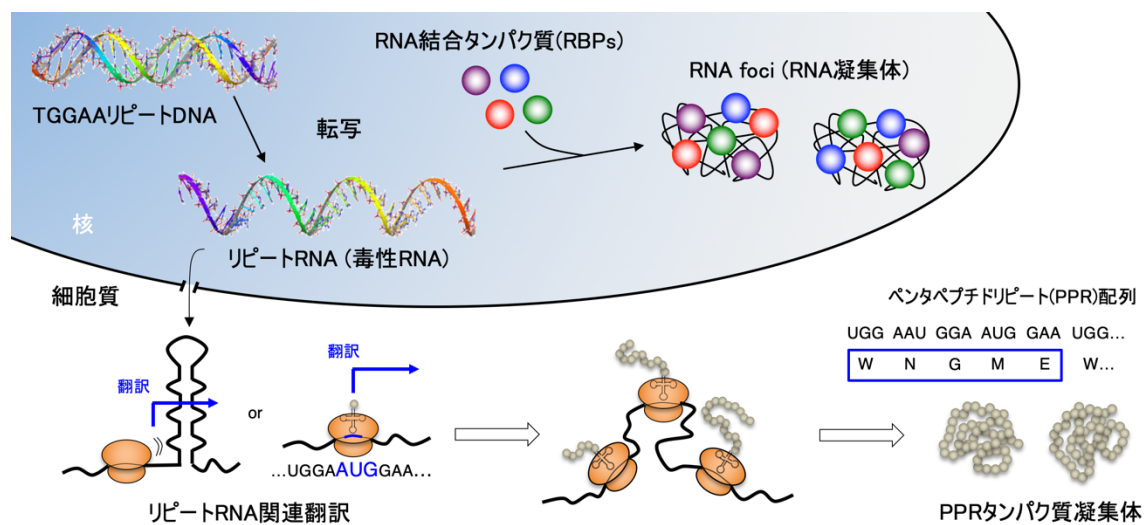
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳失調症 31 型(SCA31)は、16 番染色体の *BEAN1* と *TK2* 遺伝子が共有するイントロン領域に五塩基の繰り返し配列である TGGAA リピートが、挿入されることにより発症する遺伝性神経変性疾患である。SCA31 では、TGGAA リピートの転写により産生される UGGAA リピート RNA が、毒性を示す RNA 介在性神経変性疾患であると考えられている。その発症機構としては、リピート RNA によるスプライシング因子等の RNA 結合タンパク質の捕捉に伴う細胞核内の RNA 凝集体(RNA foci)の形成やリピート RNA から翻訳されるペンタペプチドリピータンパク質凝集体による毒性などの可能性が挙げられている。現時点で SCA31 を完治する方法はなく、発症機構の解明、症状改善に資する治療法の開発が待たれている。

SCA31 の発症機構解明の鍵は、細胞または個体レベルにおける UGGAA リピートの機能を明らかにすることであり、また症状改善や発症抑制に資する治療法開発には UGGAA リピートの機能を調節する分子ツールの開発及びその作用機序解明が重要である。

申請者は、研究室で開発された核酸結合低分子と UGGAA リピートの相互作用解析により、UGGAA リピートのヘアピン構造を安定化する低分子 MCND を見出した。さらに複眼変性を示す SCA31 ショウジョウバエモデルに MCND を投与すると、複眼変性が改善し、UGGAA リピートによる RNA 介在性神経変性に対する治療効果を示すことが示唆されたが、その作用機序などは不明である。



### 2. 研究の目的

本申請研究では、SCA31 ショウジョウバエモデルに治療効果を示した UGGAA リピート結合低分子が、SCA31 の発症機構解明に有効な分子ツールとなる可能性を詳細に検討すると同時に、更に有効性の高い分子ツールとなる可能性を持つ UGGAA リピート結合性低分子の探索を並行して進め、SCA31 の発症機構の解明と治療法開発に資するさらに有効な分子ツールの開発を目指した。

### 3. 研究の方法

申請者らの研究室では、核酸塩基と水素結合を形成することにより DNA や RNA のミスマッチ塩基対を認識するミスマッチ結合分子を開発してきた。申請者は、GAA リピート DNA に結合を示す低分子である N-メトキシカルボニル-2-アミノ-1,8-ナフチリジン二量体(MCND)が SCA31 の原因リピートである UGGAA リピートに結合

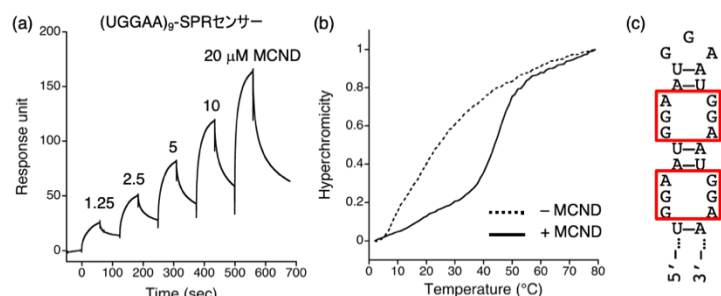


図1. (a) (UGGAA)<sub>9</sub>-SPRセンサーによる結合評価及び(b) MCNDによる(UGGAA)<sub>9</sub>ヘアピン構造の安定化 (c) UGGAAリピートのヘアピン構造

することを見出した。MCND と UGGAA リピートの相互作用解析は、UGGAA リピートを固定化したセンサーチップを用いた表面プラズモン共鳴(SPR)法及び二本鎖融解温度( $T_m$ )測定により行い、MCND が UGGAA リピートのヘアピン構造を安定化することを明らかにした(図 1)。また UGGAA リピートの発現により複眼変性を生じる SCA31 モデルショウジョウバエを用いたフェノタイプアッセイにおいて、MCND が複眼変性を抑制することが示唆

された。

本研究では、UGGAA リピート結合分子による作用機序を調べるために、RNA 結合タンパク質とリピート RNA の相互作用及び細胞核内に形成される RNA foci 形成に対する阻害効果などの検証を通じて、UGGAA リピート結合分子の作用機序を調べるとともに、さらに有効性の高い UGGAA リピート結合分子を探索するために、研究室独自の化合物ライブラリを用いてスクリーニングを行うこととした。研究開始当初は、MCND を用いて作用機序に関する研究を推進する予定であったが、UGGAA リピート結合分子の探索研究において、MCND よりも強く結合する低分子ナフチリジンカーバメートダイマー(NCD)を見出したので、NCD を用いた研究を推進した。

#### 4. 研究成果

##### (1) UGGAA リピート結合分子の探索及び結合評価

研究室で開発されたミスマッチ結合分子を含む化合物ライブラリを用いて SPR、ゲルシフトアッセイによりスクリーニングを行なった。SPR 及びゲルシフトアッセイの両方において、4つの化合物が結合を示し、それらの化合物が共通構造として NCD 構造(図 2a)を有することが明らかとなった。また  $T_m$  測定により、NCD は、UGGAA リピートに結合し、非常に安定な複合体を形成することが示唆された。

NCD と UGGAA リピートの相互作用について、さらに詳細に調べるために RNA 二重鎖に UGGAA リピートの部分構造である UGGAA/UGGAA モチーフを組み込んだ RNA を用いて  $T_m$  測定を行なった。UGGAA リピート同様、NCD は UGGAA/UGGAA モチーフを含む RNA 二重鎖の  $T_m$  を増加させた。一方で UGGAA/UGGAA モチーフ中のグアニンをアデニンへと置換した RNA の場合には、 $T_m$  の増加は見られず、4つのグアニンが NCD の結合に必要であることが示唆された。またコールドスプレーイオン化質量分析法により、複合体の化学量論比を調べたところ、NCD が 2 分子結合することが明らかになった。NCD と UGGAA/UGGAA モチーフの結合様式を明らかにするために、NMR による構造解析を行なったところ、2 分子の NCD がグアニンと相補的な水素結合を介して結合しアデニンをフリップアウトさせた複合体を形成することが明らかとなった(図 2b,c 千葉工業大学河合教授との共同研究)。

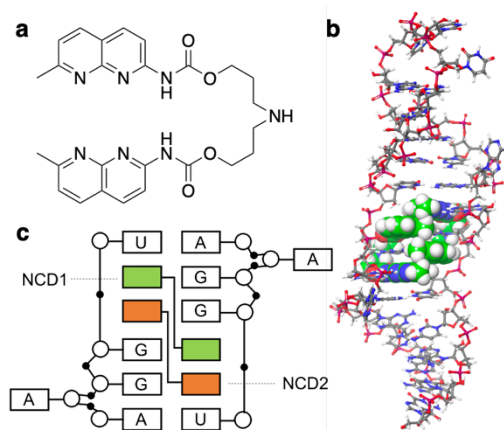


図2. a) NCDの化学構造. b)-c) NCD-RNAのNMR複合体構造及び結合様式図.

##### (2) NCD の UGGAA リピート-タンパク質相互作用に対する阻害効果検証

UGGAA リピートは、細胞核内で RNA 結合タンパク質に結合し RNA foci を形成することが知られているため、NCD が RNA 結合タンパク質の UGGAA リピートへの結合を阻害するかどうかを検証した。阻害効果を検証するアッセイ系として磁気ビーズに固定化したリピート RNA と HeLa 細胞の核抽出液を用いたプルダウンアッセイを実施し、NCD 存在下におけるプルダウン効率の相対変化量を算出することにより、RNA-タンパク質相互作用への阻害効果を評価した(図 3)。NCD 存在下、UGGAA リピート結合タンパク質として既に同定されている TDP-43、HNRNPM、SRSF9 において顕著なプルダウン効率の減少が見られた。一方でコントロール化合物として、NCD のナフチリジン環をグアニンと相補的な水素結合形成ができないキノリン環へと置換した QCD 存在下ではプルダウン効率に変化は見られず、NCD が UGGAA リピートに結合することにより、RNA-タンパク質相互作用を阻害することが示唆された(大阪大学 廣瀬教授との共同研究)。

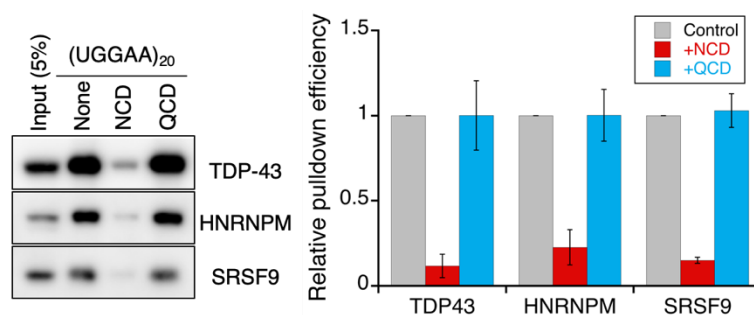


図3. NCDのUGGAAリピートへの結合によるRNA-タンパク質相互作用への影響

##### (3) NCD の核内 RNA foci 形成に対する阻害効果検証

(2)の結果より、NCDがUGGAAリピートとRNA結合タンパク質の相互作用を阻害することが示唆されたので、細胞核内に形成するUGGAAリピートRNA fociに対する影響を検証した。細胞内でのUGGAAリピートRNA fociに対する影響を調べるために、(UGGAA)<sub>76</sub>を発現するプラスミドを作製し、HeLa細胞にトランスフェクションした後、RNA fluorescence in situ hybridization (FISH)法によりRNA fociを検出した(図4)。NCD非存在下においては、RNA foci由来の蛍光シグナルが多数観測されたのに対して、NCD存在下ではRNA foci由来のシグナルが有意に減少した。またコントロール化合物として、NCDのナフチリジン環をグアニンと相補的水素結合形成ができないキノリン環へと置換したQCDを用いた場合においては、RNA fociの有意な減少は見られず、これらの結果より、NCDがRNA foci形成を阻害することが示唆された。さらに熱ストレスにより、UGGAAリピートに富んだ配列を有するHSAT III RNAが形成するnuclear stress body (nSB)と呼ばれるRNA構造体に対してもNCDがその構造形成を阻害し、nSBが関与するスプライシングなども阻害することが明らかとなった(大阪大学廣瀬教授との共同研究)。

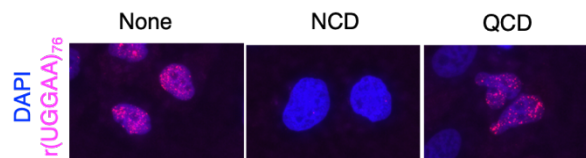


図4. NCDによるUGGAAリピートRNA foci形成の阻害

#### (4) NCDによるSCA31モデルショウジョウバエの複眼変性抑制

NCDのUGGAAリピートへの結合により、RNA-タンパク質相互作用が阻害され、RNA fociの形成が抑制されることを確認したので、SCA31モデルショウジョウバエを用いたフェノタイプアッセイを実施した。実験には、複眼にUGGAAリピートを発現することにより、複眼変性を生じるSCA31モデルショウジョウバエを用い、NCDまたはコントロール化合物

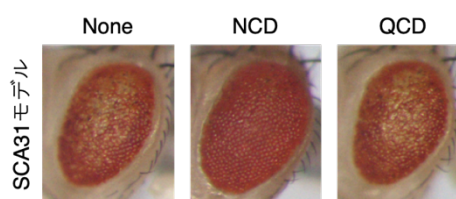


図5. SCA31モデルショウジョウバエの複眼変性抑制

としてQCDをショウジョウバエの幼虫に給餌した後、成虫の複眼を顕微鏡により観察した(図5)。化合物を給餌しない場合には、複眼面積の減少や色素欠落などが見られたが、NCDを給餌した場合には、複眼面積の増加、色素欠落の抑制などが見られた。一方でコントロール化合物であるQCDを給餌した場合には、複眼変性の抑制は観測されなかった(大阪大学永井教授、現：近畿大学、東京医科歯科大学石川教授との共同研究)。

本研究では、研究室独自の化合物ライブラリからMCNDよりも有効性の高い分子ツールとしてNCDを見出し、UGGAAリピートへの結合様式を明らかにするとともに、*in vitro*及び細胞内においてUGGAAリピートの機能を阻害することを実証した。またNCDがSCA31モデルショウジョウバエの複眼変性を抑制したことから、個体レベルにおいてRNA毒性を緩和することが示唆された。本研究成果は、SCA31の原因となるUGGAAリピートを標的とする分子ツールを提供するものであり、さらなる作用機序解明研究によりSCA31の発症機構解明や治療法開発に資する知見が得られることが期待される。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tomonori Shibata, Konami Nagano, Morio Ueyama, Kensuke Ninomiya, Tetsuro Hirose, Yoshitaka Nagai, Kinya Ishikawa, Gota Kawai, Kazuhiko Nakatani	4. 巻 12
2. 論文標題 Small molecule targeting r(UGGAA)n disrupts RNA foci and alleviates disease phenotype in Drosophila model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 236
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-20487-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 柴田知範、長野来南、上山盛夫、永井義隆、石川欽也、河合剛太、中谷和彦
2. 発表標題 脊髄小脳変性症 31 型を標的とする RNA 結合性低分子
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第14回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomonori Shibata, Konami Nagano, Morio Ueyama, Yoshitaka Nagai, Kinya Ishikawa, Gota Kawai, Kazuhiko Nakatani
2. 発表標題 RNA binding small molecule that mitigates disease phenotype in spinocerebellar ataxia type 31
3. 学会等名 The Commemorative International Symposium of the Japan Society of Nucleic Acids Chemistry (CISNAC 2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomonori Shibata
2. 発表標題 A small molecule that alleviates RNA-mediated neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 31
3. 学会等名 Aptamer in Boulder（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 脊髄小脳変性症31型抑制剤	発明者 中谷和彦、柴田知 範、永井義隆、上山 盛夫	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 実用新案、2018-73666	取得年 2018年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------